

ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー によるProstaglandin関連化合物の分析化学的研究

| | |
|-----|---|
| 著者 | 山下 幸和 |
| 号 | 229 |
| 発行年 | 1982 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/15625 |

氏 名（本籍） やま した こう わ
山 下 幸 和

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 229 号

学位授与年月日 昭和 58 年 3 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 ガスクロマトグラフィー—マススペクト
ロメトリーによる Prostaglandin 関連化
合物の分析化学的研究

（主 査）

論文審査委員 教授 南 原 利 夫 教授 山 中 宏

教授 高 野 誠 一

論文内容要旨

プロスタグランジン類 (PGs) は、生体内に微量にしか存在しないが、その生理作用はきわめて強力である。また、化学構造のわずかに異なる同族体、異性体が相反する生理作用を示す場合のあることも知られている。さらに、これら PGs はすみやかに代謝され、生理作用を示さない代謝物に変化する。それゆえ、PGs の生理作用の解明には、これらの体内動態をいわゆるアラキドン酸の代謝プロファイルとして把握することが必要であり、PGs を特異性高く、しかも高感度で分離定量し得る方法の開発が強く望まれている。

卓越した分離能を示すガスクロマトグラフィー (GC) と高感度で、しかも特異性の高いマススペクトロメトリー (MS) を直結した GC-MS、とりわけ化合物固有のイオンをモニタリングする GC-selected ion monitoring (SIM) は、優れた分析法として、生体微量成分の測定に広く用いられている。

PGs の代謝プロファイルを GC-MS で検討するにあたっては、GC-SIM に適した誘導体の選択が重要な鍵となる。

PGs は分子内に水酸基とカルボキシル基を有し、熱安定性に乏しいため、誘導体化が緩和な条件下、円滑に進行することがもとめられる。また誘導体化は、GC における分離度を改善し、生体試料中に共存する内因性物質の妨害を可及的避けるとともに、各 PGs 固有のイオンを高い相対強度で与えることが要求される。

従来、GC-SIM の誘導体調製法としては、カルボキシル基のジアゾメタンによるメチルエステル (ME) 化と水酸基の各種トリメチルシリル (TMS) 化剤によるシリルエーテル化がもっぱら用いられてきた。しかし、TMS エーテル誘導体は、反応が緩和な条件下円滑に進行する利点はあるものの、欠点も少なからずみられる。すなわち、GC における分離度が低く、したがって PGs の一斉分析が困難であること、また電子衝撃 (EI) イオン化ではトリメチルシラノール (TMSOH) 基の段階的脱離が優先し、分子イオンのみならず、近傍の高質量域に相対強度の高いイオンを生成せず、しかも加水分解され易いなどである。

そこで著者は、TMS エーテル誘導体の欠点を改良するため、各種シリルエーテル誘導体を調製し、分析化学的観点からそれらの GC-MS および安定性を検討するとともに GC-SIM による PGs の一斉分析法を確立した。さらに、これら新規シリルエーテル誘導体の特徴を考え合せ、高感度分析法として普及している電子捕獲型検出器 (ECD)-GC に適する誘導体を見出し、ECD-GC による PGs の一斉分析法を確立することに成功した。

水酸化ステロイド類のDimethylisopropylsilyl (DMiPS) エーテル誘導体のGC-MSにおける挙動

TMS 化剤にかわる新規シリル化剤として、新たにN,O-bis(dimethylisopropylsilyl)-trifluoroacetamide (iP-BSTFA) およびDMiPSイミダゾール(DMiPSI)を合成した。ついで、水酸化ステロイドをモデル化合物にとりあげ、その反応性および生成するDMiPSエーテル誘導体のGC-MSにおける挙動について基礎的検討を行った。

その結果、立体障害のない水酸基に対して、これらシリル化剤は室温で容易に反応し、副反応を伴うことなく目的とするシリルエーテル誘導体を生成することが判明した。これらの成績は、本シリル化剤がtert-butyltrimethylsilyl(t-BDMS)化剤に比して、はるかに反応性に富むことを示している。因みに立体障害のある水酸基では100～150℃、2～3hrの反応条件で円滑に本シリル化が進行した。

ここに生成したDMiPSエーテル誘導体は、マスペクトルにおいて、試料に用いた水酸化ステロイドの約60%が[M-43]⁺を基準ピークとして与えた。Dimethylethylsilyl(DMES), Dimethyln-propylsilyl(DMnPS)エーテル誘導体では側鎖の切断やシラノール基の脱離が優先し、分子量に関する情報の得難かったhydroxypregnaneにおいても、本DMiPSエーテル誘導体は[M-43]⁺を基準ピークとして与えるなど、在来のシリルエーテルがもつ欠点を克服することができた。

PGsのDMES, DMnPSならびにDMiPSエーテル誘導体のGCにおける挙動

6種のPGsならびにthromboxane B₂(TXB₂)のMEあるいはメトキシム(MO)-MEをDMES, DMnPSおよびDMiPSエーテル誘導体に導き、1.5%OV-101充填カラムを用いて分析した。その結果、DMES, DMnPSおよびDMiPSエーテル誘導体は、TMSエーテル誘導体に比べ、いずれもGCにおいて優れた分離を示し、分離能の向上に役立つことが判明した。また、これらシリルエーテル誘導体のメチレンユニット(MU)値を比較すると、シリル基中のアルキル基炭素数に比例して値の増大が観測された。MU値の増大は、PGs骨格に置換する水酸基の数に比例してみられた。そのため、炭素数の増加に伴い水酸基数の異なるPG群、すなわちPGE群とPGF群の相互分離は、TMSエーテル誘導体に比べて著しく改善された。つぎに、DMES, DMnPSならびにDMiPSエーテル誘導体のTMSエーテル誘導体に対するMU値の差で定義されるΔ[U_m]を同一PGについてとめてみた。水酸化ステロイドの場合と同様、Δ[U_m]値はPGs骨格に置換する水酸基数とよく対応しており、Δ[U_m]値をもとめることにより未知PGsの水酸基数を容易に推定できることが明らかとなった。さらに、これらシリルエーテル誘導体の相互分離の向上を目標としてソルベントレス導入装置付きwall-coated open tubular ガラスキャピラリーカラム(SE-30)を用いて検討した。その結果、従来の充填カラムを用いた場合に比較して相互分離が飛躍的に改善され、

完全分離が可能となったばかりか分析時間をも短縮することができた。

PGsのDMES, DMnPSならびにDMiPSエーテル誘導体のマスマススペクトロメトリーにおける挙動

水酸化ステロイドのDMESあるいはDMnPSエーテル誘導体は、EIマスマススペクトルにおいて分子イオン ($[M]^+$), $[M-15]^+$ および $[M-29]^+$ (あるいは $[M-43]^+$) から形成されるイオンの出現に特徴があり、これらのうち $[M-29]^+$ あるいは $[M-43]^+$ は高い相対強度でみられた。しかし、PGsの場合、DMESおよびDMnPSエーテル誘導体は対応するTMSエーテル誘導体に比較すると、シリル基中のアルキル基炭素数が増加するに伴って $[M-29]^+$ あるいは $[M-43]^+$ の相対強度は、わずかに増大する傾向がみられるものの、フラグメンテーションパターンはTMSエーテル誘導体と類似し、水酸化ステロイドにおけるような特徴はみられなかった。

一方、DMiPSエーテル誘導体のマスマススペクトルでは、 TXB_2 を除きいずれのPGsも分子イオンからイソプロピル基の脱離した $[M-43]^+$ がそれぞれ prominent ion として観測され、*t*-BDMSエーテル誘導体に近似した挙動を示すことが判明した。さらに、DMiPSエーテル誘導体は、GCにおける保持時間がDMnPSエーテル誘導体に比べてわずかに増大するにとどまり、PGsのGC-SIMに最も適した性質を具備していることが立証された。

PGsのDMES, DMnPSならびにDMiPSエーテル誘導体のECD-GCへの適用

PGsは、そのカルボキシル基をペンタフルオロベンジル (PFB) エステルに誘導することによりECD-GCによる高感度かつ特異的な定量分析が可能となる。5種のPGsおよび TXB_2 をPFBエステルに導き、ついでそれらをTMS, DMES, DMnPSおよびDMiPSエーテル誘導体としキャピラリーカラム (SE-30) で分析するとき、DMnPSエーテル誘導体が最も優れた相互分離を示した。TMSエーテル誘導体では、 PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_{1\alpha}$ および $\text{PGF}_{2\alpha}$ の分離は困難であったが、DMnPSエーテル誘導体とすることにより水酸基数の異なるPGE群とPGF群の分離は著しく改善され、PGsと TXB_2 の完全分離が可能となった。この結果、生体試料中の PGE_2 ならびに $\text{PGF}_{2\alpha}$ の定量に PGE_1 および $\text{PGF}_{1\alpha}$ を内部標準物質として用い得ることが明らかとなった。

PGsのDMESおよびDMnPSエーテル誘導体の保存安定性

TMSエーテル誘導体は、プロトン溶媒中で加水分解され易く、合成化学における水酸基の保護基としてのみならず、微量分析における誘導体としても解決されるべき問題を残している。Coreyらは、水酸基の保護基として*t*-BDMSエーテル誘導体の有用性を報告しているが、化学的諸性質については未だ詳細な検討がなされていない。

そこでまず、ステロイド水酸基を対象に、保護基としての *t*-BDMS エーテル誘導体について検討した。その結果、アルコール性およびフェノール性水酸基のシリルエールには酸、アルカリに対する安定性に差があり、シリル基のかさ高さを利用して選択的シリル化、脱シリル化が行えるなど、合成化学上きわめて有用なことが判明した。

ついで、PGs の GC あるいは GC-MS における水酸基の保護基としての DMES および DMnPS エーテル誘導体について検討した。いずれのシリルエーテル誘導体も対応する TMS 体に比較して保存安定性に優れ、プロトン溶媒を用いる各種クロマトグラフィー（シリカゲル、セファデックス LH-20 など）においても安定であり、生体試料中の PGs および TXB₂ のクリーンアップの点でも有用な保護基であることが判明した。

審 査 結 果 の 要 旨

多彩な生理作用を示すプロスタグランジン (PGs) は、生体内に微量にしか存在しないうえ、相互に構造が酷似するため、それらの分析はきわめて困難である。一方、分離能と感度に優れるガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS)、とりわけ化合物固有のイオンをモニターする GC-selected ion monitoring (SIM) は、代謝プロファイルを知るのに最も有利な方法のひとつである。しかし、それには適切な誘導体の選択が重要な鍵となる。本研究は、これらの誘導体化に有用な新規シリル化剤を開発し、その特性について基礎的検討を加えると共に、それを PGs の一斉分析に応用したものである。

まず従来から広く用いられているシリル化剤にかわる新規誘導体化剤として、N,O-bis-(dimethylisopropylsilyl) (DMiPS)-trifluoro-acetamide および imidazole を合成した。各種ステロイドをモデル化合物として、それらの反応性、生成するシリルエーテル誘導体の GC 挙動、MS の開裂パターンを検討し、卓越した特性を備えることを確認した。

ついで 6 種の PGs 並びに トロンボキサン B_2 を対象に、DMiPS エーテル誘導体の GC における挙動を精査した。その結果、メチレンユニット (MU) 値は、水酸基数に比例して増大することを見出し、TMS エーテルに対する MU 値の差で定義される $\Delta[U_m]$ から未知 PGs の水酸基数を容易に推定し得ることを示した。さらに、これら誘導体をガラスキャピラリーカラムの GC に付し、PGs の完全分離と分析の迅速化に成功した。

さらに、PGs 各種シリルエーテルの MS における開裂パターンを精査した。DMiPS エーテル誘導体は、他に比し保持値がわずかに増大するのみで、分子イオンからイソプロピル基の脱離した $(M-43)^+$ が prominent ion として観測され、GC-SIM に最も適切な性質を備えることが判明した。

最後に、PGs をペンタフルオロベンジルエステル-シリルエーテルに導き、キャピラリーカラムを用いる ECD-GC により一斉分析する方法を確立した。

以上本論文は、卓越した新規シリル化剤を開発し、GC-MS 並びに GC による高感度かつ信頼度の高い PGs の一斉分析法を確立したものであり、学位を授与するに十分値する内容と認める。